

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2837429号

(45) 発行日 平成10年(1998)12月16日

(24) 登録日 平成10年(1998)10月9日

(51) Int.Cl.*	識別記号	F I
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53 M
// C 1 2 N 15/00		C 1 2 N 15/00 A

請求項の数1(全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平1-114853	(73) 特許権者	999999999 石川 栄治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1
(22) 出願日	平成1年(1989)5月8日	(73) 特許権者	999999999 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
(65) 公開番号	特開平2-291300	(72) 発明者	石川 栄治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1
(43) 公開日	平成2年(1990)12月3日	(72) 発明者	田中 聡 大阪府茨木市大池2丁目29-7
審査請求日	平成8年(1996)4月26日	(74) 代理人	弁理士 中村 敏夫
(31) 優先権主張番号	特願平1-49575	審査官	平田 和男
(32) 優先日	平1(1989)2月28日	(56) 参考文献	特開 昭63-188399 (J P, A)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高感度特異的核酸の測定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の(A)、(B)および(C)工程を包含することを特徴とする特異的核酸の測定法。

工程(A)：被検液中の測定すべき特異的核酸と、少なくとも1種は官能基で修飾されている2種以上のプローブとを反応せしめ、官能基と特異的に結合する反応基を固定した担体に捕捉して、担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複合体を結合せしめる工程。

工程(B)：該複合体に影響を与えずに、担体から前記複合体を含む成分を解離させる工程。

工程(C)：該成分量を測定する工程。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は特異的核酸の高感度測定法に関する。

【従来の技術】

2

感染症、癌および遺伝子病の臨床検査の分野において、核酸レベルの異常は蛋白質レベルの異常に先行するため、核酸の測定は病態の把握に、病因の解析に重要な意義を持っている。

従前、前述のごとき核酸の測定はDNA(RNA)プローブを用いたハイブリダイゼーション法によって行われている。

まず、フィルター上に検体から抽出した核酸を固定し、標識プローブをハイブリダイズさせる方法(サザンブロット法、ドット法)がある(第一の技術)。この例としては、リンパ芽球細胞中のEBウイルス(Epstein-Barr Virus)の測定におけるブランズマ(J.Brandsma)らの報告[プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.US A)、第77巻、第6851頁(1980)]がある。細胞をニト

10

ロセルロース膜に固定して、DNAを変性させた後、放射性同位元素で標識したEBウィルスのDNAプローブをハイブリダイズさせて定量したものである。

また、第一のプローブを固定したフィルターに被検液中の測定すべき特異的核酸をトラップし、これに標識した第二のプローブをハイブリダイズさせる方法(サンドイッチ法)がある(第二の技術)。この例としては、鼻咽腔分泌物中のアデノウィルスの測定におけるバルバ(A. Palva)らの報告[フェムス・マイクロバイオリジカルレター(FEMS Microbiol. Lett.)第23巻 第83頁(1984)]がある。メンブレンフィルター上に固定したアデノウィルス2型のDNAプローブと放射性同位元素で標識したDNAプローブを用いて、アデノウィルスDNAを定量したものである。

第一の技術では標識DNAプローブが被検体中に多量に存在するゲノムDNAと非特異的にハイブリダイズすることにより、フィルターに吸着するため、測定の特異性が低くなるとともに、バックグラウンドが高くなり、感度が悪くなるという欠点がある。

第二の技術では、2種のプローブを用いるため、DNAを認識する特異性は高くなるが、フィルター上のDNAプローブの検体DNAトラップ能力に限界がある。もし担体の能力を大きくすれば、その結果、標識プローブのフィルターへの非特異的吸着によるバックグラウンドが大きくなり、いずれにしても高感度化は困難であった。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明の目的は、このような状況下、標識プローブの非特異的吸着による測定値のバックグラウンドを減少させて高感度のサンドイッチ法による核酸の測定法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は以下の(A)、(B)および(C)工程を包含することを特徴とする高感度特異的核酸の測定法である。

工程(A)：非検液中の測定すべき特異的核酸と、少なくとも1種は官能基で修飾されている2種以上のプローブとを反応せしめ、官能基と特異的に結合する反応基を固定した担体に捕捉して、担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複合体を結合せしめる工程。

工程(B)：該複合体に影響を与えずに、担体から前記複合体を含む成分を解離させる工程。

工程(C)：該成分量を測定する工程。

以下、本発明について工程順に従い、説明する。

工程(A)について

本工程は非検液中の測定すべき特異的核酸とプローブとを反応せしめ、担体上に核酸-プローブ複合体を結合せしめる工程である。

非検液としては、たとえば、血清、血漿、髄液、尿等の体液、測定すべき核酸を含む緩衝液が挙げられる。測定すべき特異的核酸としては、実質上、従来の核酸プロ

ーブ法で測定し得たすべての特異的DNA(RNA)が挙げられる。

例を挙げれば、①血友病A型、血友病B型、フェニルケトン尿症、 α_1 -アンチトリプシン欠損症、鎌型赤血球症、家族性アミロイドポリニューロパチー、およびハンチントン病等の遺伝子疾患のDNA ②EBウィルス、アデノウィルス、B型肺炎ウィルス、HIV、マイコプラズマ、レジオネラ、およびクラミジア等のウィルス・微生物のDNA ③神経芽細胞腫のN-myc、パーイキットリンパ腫のC-myc等の癌疾患のDNA ④心疾患におけるLDLレセプター、アポA-I、およびアポC-II等のリスクファクターのDNA等がある。

プローブとは、測定すべき特異的核酸と相補的な核酸の断片である。一般に1~20kb(キロ塩基)のものが用いられているが、合成オリゴヌクレオチドプローブ(約20~50ヌクレオチド)を用いることもできる。〔高橋DNAプローブ技術と応用、(株)シーエムシー、1988年発行〕。これらのプローブは通常(A)以下の工程において、担体または標識との結合に関与する官能基を1種または2種異常結合させて用いる。ここでいう官能基とは、プローブに導入した特異的な結合性を有する物質であり、抗原(ハプテンを含む)-抗体、酵素-補酵素等のアフィニティー結合物質対の一方を用いる。

官能基としては、例えば、ジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン、ビオチン、抗原および抗体等が挙げられる。特に分子量の小さい、ハプテンやビオチン等が好ましい。これらは公知の方法により、プローブに導入できる。ビオチン基に関しては、ランガー(P.R. Langer)〔プロシーディングス オブ ナショナル アカデミイ オブ サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)第78巻、第6633頁(1981)]、フォスター(A.C. Foster)他〔ヌクレイックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)第13巻、第745頁(1985)]等、ジニトロフェニル基に関しては、シュロイヤー(K.R. Shroyer)〔ジャーナル オブ セル バイオロジー(J. Cell. Biol.)第97巻、第377a頁(1983)]等、参照のこと。

また、官能基を結合させる際、官能基とプローブの間に核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することかできる結合を導入してもよい。このような例として、-S-S-結合、ビオチン-アビジン結合、および抗原(ハプテンを含む)-抗体結合等が挙げられる。

また、これらのプローブの一つは、工程(C)の測定の際に利用される標識を結合させて用いてもよい。標識としては免疫学的測定法において用いられるいずれの物質でもよく、酵素、放射性物質、発光物質、蛍光物質、および金属化合物等が挙げられる。例えば、酵素では、ペルオキシターゼ、 β -ガラクトシターゼ、アルカリホスファターゼ、放射性物質としては、りん(^{32}P)、ヨウ素(^{125}I)、水素(^3H)、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、発光物質としては、アクリ

ジウム塩、金属化合物としては ユーロビウム (Eu^{3+}) 等が好適である。標識を結合させる方法としては、従来の核酸プローブ法における技術を何れでも用いることができる。酵素標識プローブに関しては、レンツ (M. Renz) 他 [ヌクレイックアシズ リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第12巻、第3435頁 (1984)]、ヤブロンスキー (E. Jablonski) 他 [ヌクレイックアシズ リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第14巻、第6115頁 (1986)] : 蛍光物質標識プローブに関しては、ルース (J. Ruth) 他 [ディーエヌエー (DNA) 第3巻 第122頁 (1984)]、プロバー (J. Prober) 他 [サイエンス (Science) 第238巻 第336頁 (1987)] 等、公知の方法にて作成できる。

これらの官能基 標識は、(A) から (C) の工程に影響を及ぼさないキャリアを介在させてプローブに結合させても良い。キャリアとしては、蛋白質や鎖状の有機化合物、ポリヌクレオチド等が挙げられる。例として、アル・ハキムら [ヌクレイックアシズ リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第14巻 第9965頁 (1986)] による、DNAプローブにヒストンH1、チトクロムCおよびポリエチレンイミン (分子量60,000) を介して、ピオチン分子を結合させている報告がある。また、検体DNAとハイブリダイズしていない DNAプローブの一端と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドを介して、DNAプローブとピオチンを結合させているアーディア他 [特開昭62-188970] の技術がある。

プローブは少なくとも2種以上作成し、測定の対象や目的により、最適の組み合わせを任意に選択するが、代表例として下記のような組み合わせが挙げられる。

- ① プローブA-官能基
プローブB-標識
- ② プローブA-官能基1
プローブB-官能基2
- ③ プローブA-官能基1
プローブB-官能基2
プローブC-標識
- ④ プローブA-官能基1 官能基2
プローブB-標識

②のように標識プローブをハイブリタイズさせる時に用いない場合には、後に官能基の標識化を行う。その方法

については、工程(C)の項で述べる。
担体としては、従来サンドイッチ法測定法において使用されている物全てを使用しうる。例えば、ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス、アガロース等の他、ニトロセルロース、ナイロンが挙げられる。また、その形状はどのようなものであっても良い。担体は、工程(A)で形成される複合体を結合させるためまたは、担体上で複合体を形成させるために反応基を結合させておく。反応基は、プローブに結合された官能基と特異的に結合するものならば、どのようなものでも良

く、例えば、官能基がジニトロフェニル基、トリニトロフェニル基等のハプテンのときは、抗ハプテン抗体、官能基がピオチンのときは、アビジンまたはストレプトアビジン、官能基が抗原または抗体のときは、対応する抗体または抗原が挙げられる。

反応基の担体への結合は、免疫学的測定における担体作成の公知の方法で行われる。また、反応基と担体の間に、核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することかできる結合を導入してもよい。このような例として、-S-S-結合、ピオチン-アビジン結合、および抗原(ハプテンを含む)-抗体結合等が挙げられる。

工程(A)は次の手順で行う。

まず、被検液に2種以上のプローブを加えて、通常のDNAプローブ法で用いられる条件下、測定すべき核酸とプローブから構成される複合体を形成させる。反応は一般には20~75℃、数時間~数十時間、好ましくは65~72℃、10~20時間行う。このようにして形成された核酸-プローブ複合体は免疫学的測定に通常用いられる条件で、担体に結合させる。プローブと測定すべき核酸を反応させ、核酸-プローブ複合体形成後、担体と結合させる方法、または、プローブと測定すべき核酸と担体とを同時に加えて、核酸-プローブ複合体形成を担体上で行わせる方法等がある。後者は工程を簡略にできるので望ましい。

担体上に複合体を結合させた後、一般には担体の洗浄を行う。洗浄は免疫学的測定で用いる公知の方法で行われる。

工程(B)について

本工程はバックグラウンドの原因となる、担体に非特異的に結合した標識プローブ及び非特異的な核酸から、核酸-プローブ複合体を含む成分を選択的に分離する工程である。

複合体の解離は下記のいずれかの結合を切断して行う。

- 1) 官能基と反応基の結合
- 2) 官能基とプローブの結合
- 3) 反応基と担体の結合

核酸-プローブ複合体に影響を与えずに解離させる好ましい方法は、①上記の結合に関与する結合物質対において、一方の物質と置換しうる反応部位を有する物質を加えること、②還元剤または酸化剤を加えること、等である。具体的には、結合がジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン-抗ハプテン抗体のときには、ジニトロフェニルアミノ酸(例:ジニトロフェニルリジン)、ピオチン-アビジンまたはストレプトアビジンのときには、ピオチンを添加する。結合が-S-S-である場合、-S-S-を切断する試薬、例えば2-メルカプトエタノール等を用いる。

工程(C)について

工程(B)で解離された核酸-プローブ複合体を含む

成分を定量する工程である。

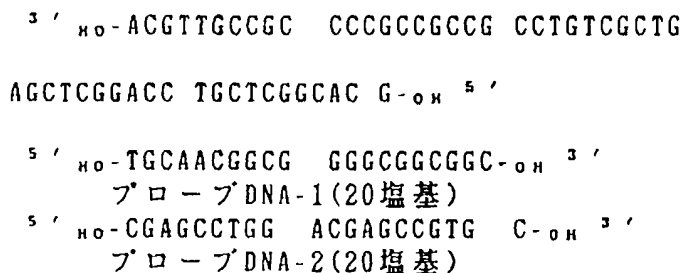
解離された核成分はそのまま溶液状態で定量しても良く、また他の担体に結合させ、洗浄後定量しても良い。この他の担体への結合は公知の材料、方法にて行うことができる。そして、免疫学的測定に通常用いられる方法で定量する。測定法の例として、放射性同位元素、酵素、蛍光物質等を用いた方法が、臨床病理〔(The Japanese Journal of Clinical Pathology)、臨時増刊特集第53号、昭和58年2月28日発行〕に総括されている。

解離された核酸-プローブ複合体を含む成分を測定するには、核成分中の標識を用いる。従って、工程(A)の項で記載したように、標識プローブを工程(A)のハイブリダイゼーションに用いない場合は、後の工程で反応基を結合させた標識を加え、核酸-プローブ複合体上の官能基に結合させて標識化を行う。

ここで用いる反応基と官能基は、工程(A)で担体と核酸-プローブ複合体との結合に用いる様なアフィニティ結合物質対であり、強い結合性を有するものが好ましい。例としてアヒジン-ビオチンが挙げられる。反応基と結合させた標識は当分野で公知の方法により作成される。標識と官能基及び反応基の選択は任意であるが、標識化に用いる反応基-官能基は、担体と核酸-プローブ複合体の結合に関与している反応基-官能基とは異なるものを選ぶ。また、担体との結合に関与しているプローブには標識を導入しない。

標識化する時点は任意であるが、溶液状態で定量する場合は、担体から核酸-プローブ複合体を最終的に解離する前に行う。また、他の担体上で定量する場合は最終的な担体洗浄の前の適切な時点を選んで行う。

検体DNA(51塩基)



³²P標識DNAプローブの調製

プローブDNA-2 10μg (1.5nmole) に対して〔γ-³²P〕アデノシン3リン酸(アマシヤム・ジャパン、東京) 20nmole (5μCi/nmole) 及びT4ポリヌクレオチド・キナーゼ(東洋紡、大阪) 80単位を用い、公知方法〔C.C.リチャードソン(C.C.Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.) 第54巻、第158頁(1965)〕で 5' 末端を³²P標識した。次いでPD-10カラム(ファルマシア、ウブサラ、スウェーデン)を用

* 例を挙げれば、①工程(A)の核酸-プローブ複合体形成後②工程(B)の複合体解離前③工程(C)の他の担体への複合体結合後、等である。

このハイブリダイゼーション終了後に標識を導入する方法は、特に酵素で標識する場合に好ましい。一般に酵素の分子量は大きいので、酵素標識プローブを用いた場合、各プローブと、測定すべき核酸とのハイブリダイゼーションが阻害されるかも知れないからである。

以上説明したように、本発明は従来の核酸サントイッチ法におけるバックグラウンドの原因であった、担体に非特異的に結合する標識プローブおよび非特異的な核酸を除くことにより、より高感度に特異的な核酸を定量する測定法を提供するものである。

以下、本発明を実施例に即して説明するがもとより、これに限られるものではない。

実施例 1

検体用DNA及びプローブ用DNAの調製

測定の検体モデル用DNA及びその一部分と相補的な配列をもつ二種のプローブ用DNAは、全自動DNA合成機MODEL 381A(アプライド・バイオシステム、カルフォルニア州)を用い、同社の操作手引書に従い、公知の方法〔M.D.マツチ(M.D.Matteucci)ら、ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ(J.Am.Chem.Soc.) 第103巻、第3185頁(1981)〕で合成した。合成後、150シリーズセパレーションシステム(アプライド・バイオシステム)を用い、逆相の高速液体クロマトグラフィーにより精製を行った。

上記の方法で調製した各DNAの塩基配列を以下に示す。

いて0.15M塩化ナトリウムおよび1mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った後、70%エタノールで沈澱させて、プローブを精製した。

ヒオチニル-DNAプローブの調製

プローブDNA-1 10μg (1.5nmole) に対して、アデノシン3リン酸(ファルマシア、ウブサラ、スウェーデン) 80nmole 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ80単位を用い、公知の方法〔C.C.リチャードソン(C.C.Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(前出)〕で5' 末端にリン酸

基を導入した。次いでリン酸基の先にアミノ基を導入し、N-ヒドロキシサクシニミジルピオチンを結合させる公知の方法〔C.F.バーハラ (C.F.Barbara) ら「ディーエヌエー (DNA)」第4巻、第327頁 (1985)」に従ってブローブDNAの5'末端にピオチン分子を導入した。反応後、前述同様PD-10カラムによるゲルろ過及びエタノール沈澱によりブローブの精製を行った。

³²Pの放射活性の測定

各ポリスチレンボールに結合した³²P放射活性の測定は、ポリスチレンボールをキシレン系液体シンチレータ ACS II (アマシャム・ジャパン、東京) 5mlを含むミニバイアル中で激しく攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (パッカート、MINAXI TRI-CARB 4000) を用いて5分間計測で行った。

ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製

(1) ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製

ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG (生化学工業、東京) 4.23gを溶解した0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.3) に0.747gの硫酸ナトリウムを少しずつ加え、0℃で30分間攪拌した後10,000×gで15分間遠心した。沈澱を4.0mlの0.0175Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.3) に溶解し、同緩衝液で透析した後、DE-52セルロース (ワットマン、ケンツ州、イギリス) カラム (1.6×8.0cm) を用いて、塩化ナトリウムの直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。IgGを含む分画を集め、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) で透析した後IgG濃度を280nmにおける吸光係数 $1.5 \times 10^{-4} \cdot \text{cm}^{-1}$ から求め、0.1g/ℓになるように同緩衝液で希釈した。

次いで、この溶液を用いてポリスチレンボール〔直径3.2mm (プレジジョン・プラスチックボール、シカゴ) 〕表面上に公知の方法〔石川ら、スキャンジナビアンジャーナル オブ イムノロジー (Scand.J.Immunol.) 第8巻 (補7) 第43頁 (1978) 〕で、物理的吸着による不溶化した。

(2) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i) メルカプトサクシニル-アビジンの調製0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に溶解したアビジンD (ヘクター社) 1mgにS-アセチルメルカプト-サクシニク-アンハイトライド (ナカライテスク、京都) を用いて、公知の方法〔石川ら、ジャーナル オブ イムノアッセイ (J.Immunoassay) 第4巻、第209頁 (1983) 〕に従ってチオール基を導入した。導入されたチオール基の数はアビジン 1分子当たり13個であった。

(ii) マレイミド-ジニトロフェニル-リシンの調製

5.5mM 2,4-ジニトロフェニル-リシン塩酸塩 (東京化成、東京) を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液

(pH7.0) 1.7mlと、5.5mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート (同仁化学、熊本) を溶解したN-ジメチルホルムアミド0.17mlとを30℃で30分反応させた。

(iii) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i) で調製したメルカプトサクシニル-アビジン0.54mgを溶解した、5mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含む、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 1.0mlと(ii) で調製したマレイミド-ジニトロフェニル-リシン溶液0.43mlとを30℃で30分反応させた後、同緩衝液に溶解した0.1M N-エチルマレイミド (ナカライテスク、京都) 5μℓを加え30℃で15分保温した。反応液をセファデックスG-25 (ファルマシア、スウェーデン) カラム (1.0×30cm) を用い、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った。アビジン 1分子当り導入されたジニトロフェニル基の数は7個であった。

(3) ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製

(1) で調製したウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化ポリスチレンボールを、

(2) で調製したジニトロフェニル-アビジンを溶解した(0.1g/ℓ)、0.1M塩化ナトリウムおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 中で、30℃10時間保温して反応させた。

ポリスチレンボールは、0.1M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含む0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 中で保存した。

30 ビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(1) N-ビオチニル-2-メルカプトエチルアミンの調製

N-ヒドロキシサクシニミジル-ピオチン (ピアスケミカル、イリノイ州) に2-メルカプトエチルアミンを用いて公知の方法〔石川ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィシカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem.Biophys.Res.Commun.)、第147巻、第644頁 (1987) 〕でチオール基を導入した。

(2) マレイミド-ウシ血清アルブミンの調製ウシ血清アルブミン (ナカライテスク、京都) にN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを用い、公知の方法〔橋田ら、ジャーナル オブ アプライド・バイオケミストリー (J.Appl.Biochem.) 第6巻、第56頁 (1984) 〕に従ってマレイミド基を導入した。導入されたマレイミド基の数は、ウシ血清アルブミン 1分子当り11個であった。

(3) ビチチニル-ウシ血清アルブミンの調製(2) で調製したマレイミド-ウシ血清アルブミン10mgを溶解した5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 2.0mlに(1) で調製したN-ビオチニル-2-メル

11

カプトエチルアミン溶液0.22mlを加え30℃、30分反応させた。反応後、0.1M 2-メルカプトエチルアミンを溶解した5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0) 0.05mlを加え、セファデックスG-25(ファルマシア、スウェーデン)カラム(1.0×30cm)を用い、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)でゲルろ過を行った。ウシ血清アルブミン1分子当りに導入されたビオチン分子は7個であった。

(4) ビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(3)で調製したビオチニル-ウシ血清アルブミン溶液(0.1g/l)を用いて、ポリスチレンボール〔直径3.2mm(プレシジョン社、シカゴ)〕表面上に公知の方法〔石川ら、スキャンシナピアンジャーナル オブ イムノロジー(前出)〕で、物理的吸着により不溶化した。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA(n=6)、5ng/μl³²P標識DNAプローブ、5ng/μlビオチニル-DNAプローブ、100ng/μlサケ精子の単鎖DNA、0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 0.15mlを65℃、1時間保温した。室温に戻した後、ジニトロフェニル-アヒシン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、30℃5時間反応させた。ボールを0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 2mlで2回洗浄した後、150nmoleのジニトロフェニル-L-ヒスチン(東京化成工業、東京)を溶解した0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 0.15ml中でビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化ポリスチレンボール1個とともに30℃、2時間反応させた。ジニトロフェニル-アヒシン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化ポリスチレンボールを除去した後、さらに30℃、3時間反応させた。ポリスチレンボールを上述と同様に洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した³²Pの放射活性を測定した。結果を第1図に示す。

比較例 1

検体用およびプローブ用DNAの調製、固相の調製、および放射活性の測定は実施例1の方法に従った。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA(n=6)、5ng/μl³²P標識DNAプローブ、5ng/μlビオチニル-DNAプローブ、100ng/μlサケ精子の単鎖DNA、0.15M塩化ナトリウム1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 0.15mlを65℃、1時間保温した。室温に戻した後、ジニトロフェニル-アヒシン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、30℃で5時

12

間反応させた。ポリスチレンボールを0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0) 2mlで2回洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した³²Pの放射活性を測定した。結果を第1図に示す。

本発明による実施例の測定限界は10pg(0.6fmole)であった。従来法である比較例に比して、バックグラウンドが約1/8に減少し、3倍の感度向上が認められた。

実施例 2

- 10 検体用DNA及びプローブ用DNAの調製、³²P識別DNAプローブの調製、及びウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製は実施例1の方法に従った。

ジニトロフェニル-DNAプローブの調製

(1) 5'-アミノヘキシルホスホールアミデート-DNAの調製

- 20 プローブDNA=10μg(1.5nmole)に対して、アデニン3リン酸(ファルマシア、ウプサラ スウェーデン) 80nmole及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ80単位を用い、公知の方法〔C.C.リチャードソン(C.C. Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(前出)〕で5'-末端にリン酸基を導入した。次いで、0.1Mイミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.0)で、1-エチル-3,3'-ジメチルカルボジイミド(ナカライテスク、京都)により導入したリン酸基に、イミド基を結合させた後、1,6-ジアミノヘキサン(ナカライテスク)を反応させる公知の方法〔A.コレット(A. Chollet)ら、ヌクレイックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)、第13巻、第1529頁(1985)〕に従って、5'-末端にアミノ基を導入した。

(2) サクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸の合成

2,4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸(シグマ社、ミズーリ州)と、N-ヒドロキシサクシニミド(和光純薬工業、大阪)をジクロロカルボジイミド(和光純薬工業)により縮合される公知の方法〔F.レヴィ・シェファー(F. Levi-Schaffer)ら、アメリカン ジャーナル オブ トロピカル メディシン アンド ハイジーン(Am. J. Trop. Med. Hyg.)、第32巻、第343頁(1983)〕によりサクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸を合成した。次いで、シリカゲル(40μm)カラムを用い、クロロホルム/メタノール〔40:1(V/V)〕の系で精製を行った後、NMR(核磁気共鳴法)および質量スペクトル法による製造を確認した。

(3) ジニトロフェニル-DNAプローブの調製

- (1)で調製した5'-アミノヘキシルホスホールアミデート-DNA 150pmoleを溶解した0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.5) 50μlに、(2)で調製したサクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル-ε-カプロン酸50n

moleを含むN,N-ジメチルホルムアミド50 μ lを加え、20°C、20時間反応させた。反応後RPC-5カラム（アブライト・バイオシステム）を用いる公知の方法（R.L.ピアソン（R.L. Pearson）ら バイオケミカル エト バイオフィジカ アクタ（Biochem. Biophys. Acta）第228巻 第770頁（1971））で高速液体クロマトグラフィーを行って未反応DNAを除き、さらにエタノール沈殿によりグローブを精製した。

³²Pの放射活性の測定

反応溶液に含まれる³²P放射活性の測定は、反応溶液全量（150 μ l）をキシレン系液体シンチレータACS I 1（アマシャム・ジャパン、東京）5mlを含むミニバイアル中で激しく攪拌した後、液体シンチレーションカウンタ（バッカード、MINAXI TRI-CARB 4000）を用いて5分間計測で行った。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA（n = 6）、2ngの³²P標識DNAグローブ、2ngのジニトロフェニル-DNAグローブ、100ngのサケ精子の単鎖DNA、0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）0.15mlを65°C、16時間保温した。室温に戻した後、ウサギ（抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、40°C、5時間反応させた。ボールを0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）2mlで2回洗浄した後、150nmoleのジニトロフェニル-L-リジン（東京化成工業、東京）を溶解した、0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）0.15ml中で30°C、2時間反応させた。

反応後溶液150 μ l全量を取り、標識DNAグローブの³²P放射活性を測定した。結果を第2図に示す。

比較例 2

検体DNA、ジニトロフェニルDNAグローブ、³²P標識DNA

グローブおよびウサギ（抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG不溶化固相の調製は実施例1の方法に従った。

³²P放射活性の測定

各ポリスチレンボールに結合した³²P標識DNAグローブの放射活性の測定は、ポリスチレンボールを液体シンチレータを含むミニバイアルに入れ、実施例と同様の条件で計測を行った。

検体DNAの測定

種々の濃度に希釈した検体DNA（n = 6）、2ngの³²P標識DNAグローブ、2ngのジニトロフェニル-DNAグローブ、100ngのサケ精子の単鎖DNA、0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTAおよび0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）0.15mlを65°C、16時間保温した。室温に戻した後、ウサギ（抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG不溶化ポリスチレンボールを1個添加し、30°Cで5時間反応させた。ポリスチレンボールを0.15M塩化ナトリウム、1mM EDTA及び0.1%ウシ血清アルブミンを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）2mlで2回洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した³²Pの放射活性を測定した。結果を第2図に示す。

本発明による実施例の測定限界は0.9pg（50amole = 5×10^{-7} mole）であった。従来法である比較例に比して、バックグラウンドが約1/3に減少し、3倍の感度向上が認められた。

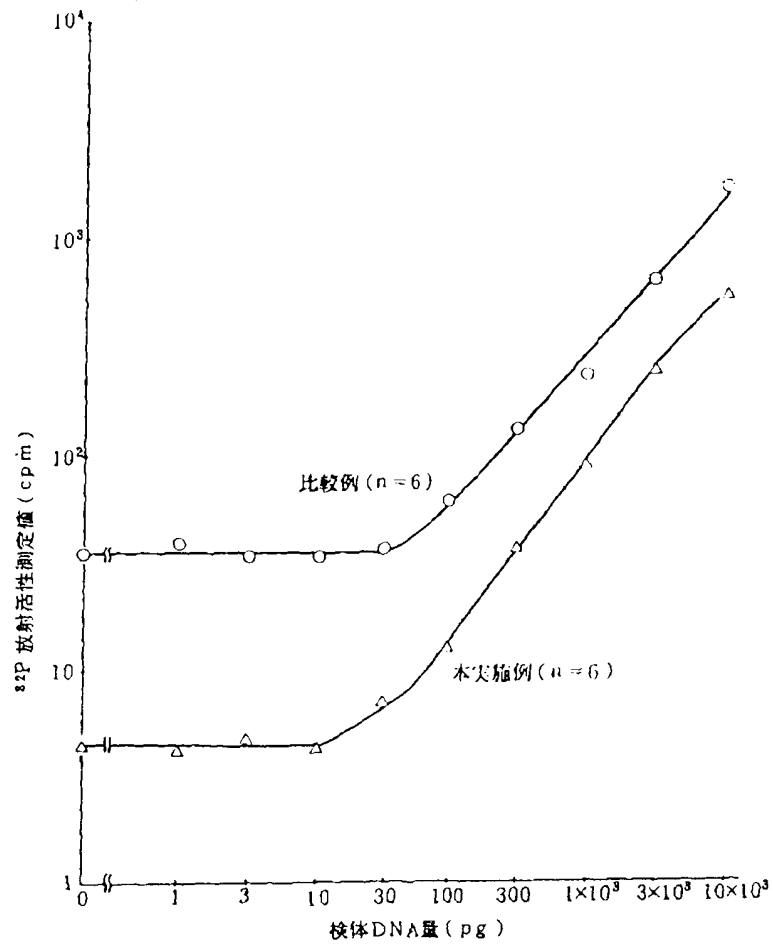
〔効果〕

以上、説明したように、本発明は従来サンドイッチ法で測定しえた核酸を、より高感度に測定しうる方法を提供するものである。

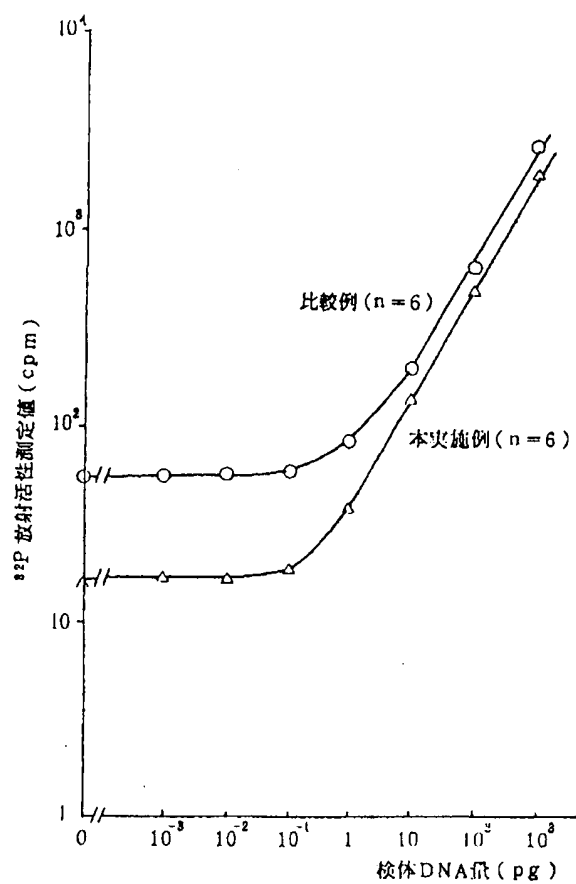
【図面の簡単な説明】

第1図及び第2図は、本発明の実施例、及び比較例のDNA測定における検量線である。横軸は、測定対象のDNA量、縦軸に測定値（³²P放射活性）を示した。

【第1図】



【第2図】



フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁸, DB名)

C12Q 1/68

G01N 33/53

Med line

(19)【発行国】
日本国特許庁(JP)
(12)【公報種別】
特許公報(B2)
(11)【特許番号】
第2837429号
(45)【発行日】
平成10年(1998)12月16日
(43)【公開日】
平成2年(1990)12月3日
(24)【登録日】
平成10年(1998)10月9日
(21)【出願番号】
特願平1-114853
(22)【出願日】
平成1年(1989)5月8日
【審査請求日】
平成8年(1996)4月26日
(45)【発行日】
平成10年(1998)12月16日
(43)【公開日】
平成2年(1990)12月3日
(54)【発明の名称】
高感度特異的核酸の測定法

(51)【国際特許分類第6版】
C12Q 1/68
G01N 33/53
// C12N 15/09
【FI】
C12Q 1/68 A
G01N 33/53 M
C12N 15/00 A
【請求項の数】
1

(19) [Publication Office]
Japan Patent Office (JP)
(12) [Kind of Document]
Japanese Patent Publication (B2)
(11) [Patent Number]
28 th 37429 numbers
(45) [Issue Date]
1998 (1998) December 16 days
(43) [Publication Date of Unexamined Application]
1990 (1990) December 3 days
(24) [Registration Date]
1998 (1998) October 9 days
(21) [Application Number]
Japan Patent Application Hei 1 - 114853
(22) [Application Date]
1989 (1989) May 8 days
[Request for Examination day]
1996 (1996) April 26 days
(45) [Issue Date]
1998 (1998) December 16 days
(43) [Publication Date of Unexamined Application]
1990 (1990) December 3 days
(54) [Title of Invention]
**MEASUREMENT METHOD OF HIGH SENSITIVITY
SPECIFIC NUCLEIC ACID**
(51) [International Patent Classification, 6th Edition]
C12Q 1/68
G01N 33/53
//C12N 15/09
[FI]
C12Q 1/68 A
G01N 33/53 M
C12N 15/00 A
[Number of Claims]
1

【全頁数】

9

(56)【参考文献】

【文献】

特開 昭63-188399(JP, A)

(58)【調査した分野】

(Int. Cl. 6, DB名)C12Q 1/68G01N 33/53Medl
ine

(65)【公開番号】

特開平2-291300

(31)【優先権主張番号】

特願平1-49575

(32)【優先日】

平1(1989)2月28日

(33)【優先権主張国】

日本(JP)

(73)【特許権者】

【識別番号】

999999999

【氏名又は名称】

石川 栄治

【住所又は居所】

宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

(73)【特許権者】

【識別番号】

999999999

【氏名又は名称】

住友製薬株式会社

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)【発明者】

【氏名】

石川 栄治

【住所又は居所】

[Number of Pages in Document]

9

(56) [Cited Reference(s)]

[Literature]

Japan Unexamined Patent Publication Sho 63 - 188399
(JP.A)

(58) [Field of Search]

(International Class 6,DB name) C12Q 1/68G01N 33/53Me dl
ine

(65) [Publication Number of Unexamined Application (A)]

Japan Unexamined Patent Publication Hei 2 - 291300

(31) [Priority Application Number]

Japan Patent Application Hei 1 - 49575

(32) [Priority Date]

Flat 1 (1989) February 28 day

(33) [Priority Country]

Japan (JP)

(73) [Patent Rights Holder]

[Identification Number]

999999999

[Name]

Ishikawa Eiji

[Address]

Miyazaki Prefecture Miyazaki City Otsuka platform west 3
-Chome 24 TH 1

(73) [Patent Rights Holder]

[Identification Number]

999999999

[Name]

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

[Address]

Osaka Prefecture Osaka City Chuo-ku Doshu-cho 2-2-8

(72) [Inventor]

[Name]

Ishikawa Eiji

[Address]

宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

Miyazaki Prefecture Miyazaki City Otsuka platform west 3
-Chome 24 TH 1

(72)【発明者】

(72) [Inventor]

【氏名】

[Name]

田中 聡

Tanaka Satoshi

【住所又は居所】

[Address]

大阪府茨木市大池2丁目29—7

Osaka Prefecture Ibaraki City Oike 2-Chome 29—7

(74)【代理人】

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

【弁理士】

[Patent Attorney]

【氏名又は名称】

[Name]

中村 敏夫

Nakamura Toshio

【審査官】

[Examiner]

平田 和男

Hirada Kazuo

(57)【特許請求の範囲】

(57)[Claim(s)]

【請求項 1】

[Claim 1]

下記の(A)、(B)および(C)工程を包含することを
特徴とする特異的核酸の測定法。Description below (A), (B) and (C) step is included
measurement method。 of the specific nucleic acid which
densely is made feature工程(A):被検液中の測定すべき特異的核酸と、
少なくとも1種は官能基で修飾されている2種以
上のプローブとを反応せしめ、官能基と特異的
に結合する反応基を固定した担体に捕捉して、
担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複
合体を結合せしめる工程。As for specific nucleic acid and at least 1 kind which inside of
step (A):test solution should measure probe of 2 kinds or
more which are decorated with functional group reacting,
trapping doing in support which locks reacted group which
itconnects to functional group and specific, on support probe
step。 which connects conjugate which consists of nucleic
acid which it shouldmeasure工程(B):該複合体に影響を与えずに、担体から
前記複合体を含む成分を解離させる工程。Without producing effect on step (B):said conjugate, step。
which the component which includes aforementioned
conjugate from support dissociated is done

工程(C):該成分量を測定する工程。

step。 which measures step (C):said content

【発明の詳細な説明】

[Description of the Invention]

〔産業上の利用分野〕

"Industrial Area of Application "

本発明は特異的核酸の高感度測定法に関する。

this invention regards high sensitivity measurement method of specific nucleic acid.

【従来技術】

[Prior Art]

感染症、癌および遺伝子病の臨床検査の分野
において、核酸レベルの異常は蛋白質レベルの
異常に先行するため、核酸の測定は病態の把In field of laboratory test of infection、 cancer and genetic
disease, as for fault of nucleic acid level in order to precede in
fault of protein level,measurement of nucleic acid in grasp of

握に、病因の解析に重要な意義を持っている。

従前、前述のごとき核酸の測定は DNA(RNA)プローブを用いたハイブリダイゼーション法によって行われている。

まず、フィルター上に検体から抽出した核酸を固定し、標識プローブをハイブリダイズさせる方法(サザンブロット法、ドット法)がある(第一の技術)。

この例としては、リンパ芽球細胞中の EB ウィルス(Epstein-Barr Virus)の測定におけるブランズマ(J.Brandsma)らの報告[プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)、第 77 巻、第 6851 頁(1980)]がある。

細胞をニトロセルロース膜に固定して、DNA を変性させた後、放射性同位元素で標識した EB ウィルスの DNA プローブをハイブリダイズさせて定量したものである。

また、第一のプローブを固定したフィルターに被検液中の測定すべき特異的核酸をトラップし、これに標識した第二のプローブをハイブリダイズさせる方法(サンドイッチ法)がある(第二の技術)。

この例としては、鼻咽喉分泌物中のアデノウィルスの測定におけるパルバ(A.Palva)らの報告[フェムス マイクロバイオロジカルレター(FEMS Microbiol.Lett.)第 23 巻、第 83 頁(1984)]がある。

メンブレンフィルター上に固定したアデノウィルス 2 型の DNA プローブと放射性同位元素で標識した DNA プローブを用いて、アデノウィルス DNA を定量したものである。

第一の技術では標識 DNA プローブが被検体中に多量に存在するゲノム DNA と非特異的にハイブリダイズすることにより、フィルターに吸着するため、測定の特異性が低くなるとともに、バックグラウンドが高くなり、感度が悪くなるという欠点がある。

第二の技術では、2 種のプローブを用いるため、DNA を認識する特異性は高くなるが、フィルター上の DNA プローブの検体 DNA トラップ能力に限界がある。

もし担体の能力を大きくすれば、その結果、標識プローブのフィルターへの非特異的吸着によるバックグラウンドが大きくなり、いずれにしても高感度化は困難であった。

〔発明が解決しようとする課題〕

disease, has important meaning in analysis of cause of disease.

Heretofore, measurement of aforementioned or other nucleic acid is done with the hybridization method which uses DNA (RNA) probe.

First, it locks nucleic acid which on filter is extracted from the test agent, there is a method (Southern blot method and dot method) which labelled probe hybridize is done, (technology of first).

As this example, Bu run ズマ in measuring EBvirus (Epstein-Barr Virus) in the lymphoblast cell (J.Brand sma) and others there is a report "proceedings of national academy of Science (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424)), Vol.77, 6th 851 page (1980)".

Locking cell in nitrocellulose membrane, DNA after modified, hybridize doing DNA probe of EBvirus which labelling it does with corresponding radioactive element, it is something which quantification is done.

In addition, trap it does specific nucleic acid which inside of test solution should measure in filter which locks probe of first there is a method (sandwich method) which second probe which labelling is done hybridize is done in this, (second technology).

As this example, pas jp11 バ in measuring adenovirus in nose laryngopharynx secretion (A. Pa lva) and others there is a report "フェムス micro biological letter (FEMS Microbiology Lett.) Vol.23, 8th 3 page (1984)".

It is something which adenovirus DNA quantification is done making use of the DNA probe which labelling is done with DNA probe and corresponding radioactive element of the adenovirus type 2 which is locked on membrane filter.

In order to adsorb into filter with technology of first by the hybridize doing in genomic DNA and nonspecific where labelling DNA probe in object being tested exists in large amount, as specificity of measurement becomes low, the background becomes high, there is a deficiency that sensitivity becomes bad.

With second technology, in order to use probe of 2 kinds, as for specificity which recognizes DNA it becomes high, but in DNA puller Bu's on filter there is a limit test agent DNA trap capacity.

If capacity of support was enlarged, as a result, background became large with nonspecific adsorption to filter of labelled probe, in any case the increasing sensitivity was difficult.

"Problems That Invention Seeks to Solve"

本発明の目的は、このような状況下、標識プローブの非特異的吸着による測定値のバックグラウンドを減少させて高感度のサンドイッチ法による核酸の測定法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は以下の(A)、(B)および(C)工程を包含することを特徴とする高感度特異的核酸の測定法である。

工程(A):非検液中の測定すべき特異的核酸と、少なくとも1種は官能基で修飾されている2種以上のプローブとを反応せしめ、官能基と特異的に結合する反応基を固定した担体に捕捉して、担体上にプローブと測定すべき核酸からなる複合体を結合せしめる工程。

工程(B):該複合体に影響を与えずに、担体から前記複合体を含む成分を解離させる工程。

objective of this invention, under this kind of condition, decreasing background of measured value with nonspecific adsorption of labelled probe, is to offer measurement method of nucleic acid with sandwich method of high sensitivity.

"means in order to solve problem "

this invention below (A), (B) and includes (C) step is measurement method of the high sensitivity specific nucleic acid which densely is made feature.

step (A): as for specific nucleic acid and at least 1 kind which inside of thenon- test liquid should measure probe of 2 kinds or more which are decoratedwith functional group reacting, trapping doing in support which locks the reacted group which it connects to functional group and specific, on support the probe step. which connects conjugate which consists of nucleic acid which it should measure

Without producing effect on step (B):said conjugate, step. which the component which includes aforementioned conjugate from support dissociated is done

工程(C):該成分量を測定する工程。	
step. which measures step (C):said content	
以下、本発明について工程順に従い、	説明する。
Below, concerning this invention in process sequence following,	You explain.
工程(A)について	
In step (A) being attached	

とを反応せしめ、担体上に核酸-プローブ複合体を結合せしめる工程である。

非検液としては、たとえば、血清、血漿、髄液、尿等の体液、測定すべき核酸を含む緩衝液が挙げられる。

測定すべき特異的核酸としては、実質上、従来の核酸プローブ法で測定し得たすべての特異的DNA(RNA)が挙げられる。

例を挙げれば、1 血友病 A 型、血友病 B 型、フェニルケトン尿症、 α_1 -アンチトリプシン欠損症、鎌型赤血球症、家族性アミロイドポリニューロパチー、およびハンチントン病等の遺伝子疾患の DNA 2EB ウィルス、アデノウィルス、B 型肺炎ウィルス、HIV、マイコプラズマ、レジオネラ、およびクラミジア等のウィルス・微生物の DNA 3 神経芽細胞腫の N-myc、パーイキットリンパ腫の C-myc 等の癌疾患の DNA 4 心疾患における

Reacting, it is a step which connects nucleic acid-probe conjugate on support.

As non- test liquid, you can list buffer which includes nucleic acid which for example blood serum、 blood plasma、 spinal fluid、 urine or other body fluid、 it should measure.

With respect to substance, it measures with conventional nucleic acid probe method as specific nucleic acid which it should measure, it can list all specific DNA (RNA) which are acquired.

If you list example, 1 hemophilia A type、 hemophilia B type、 phenyl ketone urine symptom, the;al ₁-antitrypsin defect a symptom, afalcate hematologic disease、 family characteristic amyloid poly neuropathy、 and a DNA 2EBvirus、 adenovirus、 B type pneumonia virus、 HIV、 mycoplasma、 Legionella、 of Huntington's disease or other gene disorder and a LDLreceptor、 アポ A-I、 and a DNA etc of アポ C-IIor other risk factor in DNA 4 heart disease of the C-mycor other

LDLレセプター、アポ A-I、およびアポ C-II 等のリスクファクターの DNA 等がある。

プローブとは、測定すべき特異的核酸と相補的な核酸の断片である。

一般に1~20kb(キロ塩基)のものが用いられているが、合成オリゴヌクレオチドプローブ(約 20~50ヌクレオチド)を用いることもできる。

[高橋、DNA プローブ-技術と応用-、(株)シーエムシー、1988 年発行]。

これらのプローブは通常(A)以下の工程において、担体または標識との結合に参与する官能基を1種または2種異常結合させて用いる。

ここでいう官能基とは、プローブに導入した特異的な結合性を有する物質であり、抗原(ハプテンを含む)-抗体、酵素-補酵素等のアフィニティー結合物質対の一方を用いる。

官能基としては、例えば、ジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン、ビオチン、抗原、および抗体等が挙げられる。

特に分子量の小さい、ハプテンやビオチン等が好ましい。

これらは公知の方法により、プローブに導入できる。

ビオチン基に関しては、ランガー(P.R.Langer)[プロシーディングス オブ ナショナル アカデミーオブ サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)第 78巻、第 6633 頁(1981)]、フォスター(A.C.Foster)他[ヌクレイックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)第 13 巻、第 745 頁(1985)]等、ジニトロフェニル基に関しては、シュロイヤー(K.R.Shroyer)[ジャーナルオブ セル バイオロジー(J.Cell.Biol.)第 97 巻、第 377a 頁(1983)]等、参照のこと。

また、官能基を結合させる際、官能基とプローブの間に核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することができる結合を導入してもよい。

このような例として、-S-S-結合、ビオチン-アビジン結合、および抗原(ハプテンを含む)-抗体結合等が挙げられる。

また、これらのプローブの一つは、工程(C)の測定の際に利用される標識を結合させて用いても

cancer disorder of N- myc、bar I kit lymphoma of DNA 3 neuroblastoma of Chlamydia or other virus * microorganism there is.

probe is fragment of specific nucleic acid and complementary nucleic acid which it should measure.

Those of 1 - 20 kb (kilobase) are used generally, but it is possible also to use synthetic oligonucleotide probe (Approximately 20 - 50 nucleotide).

"Takahashi、DNA probe-technology and application -, K.K. CMC、1988 issue".

These probe use one or two kinds abnormal bond doing functional group which participates in the connection with support or labelling usually in step below the (A).

functional group referred to here, with substance which possesses specific binding characteristic which is introduced into probe, antigen (haptens are included.) -antibody、enzyme-coenzyme or other Affinity binding substance one side of pair is used.

As functional group, you can list for example di nitrophenyl group or tri nitrophenyl group or other haptens、biotin、antigen、and antibody etc.

Especially, molecular weight it is small, haptens and biotin etc are desirable.

It can introduce these into probe due to known method .

In regard to biotin basis, it must be, a reference such as Trachycarpus fortunei (Hook) H.Wendl. ear (K.R.Shroyer) "Journal of Cell Biology (ISSN 0021-9525, CODEN JCLBA3) (Journal of Cell Biology (0021 - 9525, JCLBA3)) Vol.97、377 page (1983)" run Ganger (P.R.Langer) "proceedings of national academy of Science (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027 - 8424)) Vo.78、6th 633 page (1981)", in regard to, di nitrophenyl group such as Foster (A.C.Foster) other "nucleic acid misalignment search (Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD)) Vol.13、7th 45 page (1985)".

In addition, occasion where functional group is connected, without producing effect on nucleic acid-probe conjugate between functional group and probe, it is possible to introduce connection which can be cut off.

As this kind of example, -S-S- you can list connection, biotin-avidin connection, and antigen (haptens are included.) -antibody connection etc.

In addition, connecting labelling which is utilized case of measurement of step (C), it is possible to use one of these

よい。

標識としては免疫学的測定法において用いられるいずれの物質でもよく、酵素、放射性物質、発光物質、蛍光物質、および金属化合物等が挙げられる。

例えば、酵素では、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、放射性物質としては、りん(^{32}P)、ヨウ素(^{125}I)、水素(^3H)、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、発光物質としては、アクリジウム塩、金属化合物としては、ユーロピウム(Eu^{3+})等が好適である。

標識を結合させる方法としては、従来の核酸プローブ法における技術を何れでも用いることができる。

酵素標識プローブに関しては、レンツ(M.Renz)他[ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)第12巻、第3435頁(1984)]、ヤブロンスキー(E.Jablonski)他[ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)第14巻、第6115頁(1986)]: 蛍光物質標識プローブに関しては、ルース(J.Ruth)他[ディーエヌイー(DNA)第3巻、第122頁(1984)]、プロバー(J.Prober)他[サイエンス(Science)第238巻、第336頁(1987)]等、公知の方法にて作成できる。

これらの官能基、標識は、(A)から(C)の工程に影響を及ぼさないキャリアを介在させてプローブに結合させても良い。

キャリアとしては、蛋白質や鎖状の有機化合物、ポリヌクレオチド等が挙げられる。

例として、アル・ハキムら[ヌクレックアシズ リサーチ(Nucleic Acids Res.)第14巻、第9965頁(1986)]による、DNA プローブにヒストン H1、チトクロム C およびポリエチレンイミン(分子量60,000)を介して、ビオチン分子を結合させている報告がある。

また、検体 DNA とハイブリダイズしていない、DNA プローブの一端と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドを介して、DNA プローブとビオチンを結合させているアーディア他[特開昭62-188970]の技術がある。

プローブは少なくとも2種以上作成し、測定の対象や目的により、最適の組み合わせを任意に選択するが、代表例として下記のような組み合わせが挙げられる。

probe.

As labelling it is good any substance which is used in immunological measurement method can list enzyme, radioactive substance, light emitting substance, phosphor, and metal compound etc.

europium (Eu^{3+}) etc is ideal as acry di ウム salt, metal compound as fluorescein isothiocyanate, light emitting substance as the peroxidase, ;be -galactosidase, alkaline phosphatase, radioactive substance, phosphorus (^{32}P), iodine (^{125}I), hydrogen (^3H), as the phosphor, with for example enzyme.

technology in conventional nucleic acid probe method as method which connects labelling, canbe used whichever.

In regard to enzyme labelled probe, loose (J.Ruth) other things "D. N. A. (DNA) Volume 3, 12th 2 page (1984)", it can draw up, with known method such as professional bar (J. probe r) other "Science (Science) 23 rd Vol.8, 33rd 6 page (1987)" Lenz (M.Renz) other things "nucleic アシ missalignment search (Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD)) Vol.12, third 435 page (1984)", in regard to ヤブロン ski (E.Jablons ki) other "nucleic アシ missalignment search (Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD)) Vol.14, 6th 115 page (1986)":phosphor labelled probe.

These functional group, labelling, lying between, are good connecting carrier which from(A) does not exert influence on step of (C) to probe.

As carrier, you can list protein and organic compound, polynucleotide etc of chain.

As example, with al * Ha Kim and others "nucleic アシ missalignment search (Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD)) Vol.14, 9th 965 page (1986)", through histone H1, cytochrome C and polyethylene imine (molecular weight 60,000) in DNA probe, there is report which connects the biotin molecule.

In addition, test agent DNA and hybridize it has not done, through the one end of DNA probe and polynucleotide which possesses complementary base sequence, there is a technology of A D. ア other "Japan Unexamined Patent Publication Showa 6 2- 188970 " which connects DNA probe and biotin.

at least 2 kinds to draw up probe, due to object and objective of measurement, combination of optimum is selected in option asdescription below you can list combination, but as representative example.

	プローブA-官能基プローブB-標識	
--	-------------------	--

<GAI ID=0001>	probe A - functional group probe B - labelling	
	プローブA-官能基1 プローブB-官能基2	
<GAI ID=0002>	probe A - functional group 1 probe B - functional group 2	
	プローブA-官能基1 プローブB-官能基2 プローブC-標識	
<GAI ID=0003>	probe A - functional group 1 probe B - functional group 2 probe C - labelling	
	プローブA-官能基1、	官能基2
<GAI ID=0004>	probe A - functional group 1、	functional group 2
プローブB-標識		
probe B - labelling		

いない場合には、後に官能基の標識化を行う。

その方法については、工程(C)の項で述べる。

担体としては、従来サンドイッチ法測定法において使用されている物全てを使用しうる。

例えば、ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス、アガロース等の他、ニトロセルロース、ナイロンが挙げられる。

また、その形状はどのようなものであっても良い。

担体は、工程(A)で形成される複合体を結合させるため、または、担体上で複合体を形成させるために反応基を結合させておく。

反応基は、プローブに結合された官能基と特異的に結合するものならば、どのようなものでも良く、例えば、官能基がジニトロフェニル基、トリニトロフェニル基等のハプテンのときは、抗ハプテン抗体、官能基がビオチンのときは、アビジンまたはstreptavidin、官能基が抗原または抗体のときは、対応する抗体または抗原が挙げられる。

反応基の担体への結合は、免疫学的測定における担体作成の公知の方法で行われる。

また、反応基と担体の間に、核酸-プローブ複合体に影響を与えずに切断することができる結合を導入してもよい。

When it is not, labelling of functional group is done afterwards.

Concerning method, you express with section of step (C).

As support, it can use thing all which is used until recently in sandwich method measurement method.

for example polystyrene, poly acrylic, Teflon, paper, glass, agarose or other other things, you can list nitrocellulose, nylon.

In addition, configuration is good any kind of ones.

support in order to connect conjugate which is formed with step (A), or, connects reacted group in order to form conjugate on support.

As for reacted group, a functional group which is connected to probe and if something which is connected to specific it is, when it is good any kind of ones, for example functional group is di nitrophenyl group, bird nitrophenyl group or other hapten, when anti-hapten antibody, functional group is the biotin, when avidin or ス pick-up プ jp7 avidin, functional group is antigen or antibody, you can list antibody or antigen which corresponds.

As for connection to support of reacted group, it is done with known method of support compilation in immunological measuring.

In addition, between reacted group and support, without producing effect on nucleic acid-probe conjugate, it is possible to introduce connection which can be cut off.

このような例として、-S-S-結合、ビオチン-アビジン結合、および抗原(ハプテンを含む)-抗体結合等が挙げられる。

工程(A)は次の手順で行う。

まず、被検液に 2 種以上のプローブを加えて、通常の DNA プローブ法で用いられる条件下、測定すべき核酸とプローブから構成される複合体を形成させる。

反応は一般には 20~75℃、数時間~数十時間、好ましくは 65~72℃、10~20 時間行う。

このようにして形成された核酸-プローブ複合体は免疫学的測定に通常用いられる条件で、担体に結合させる。

プローブと測定すべき核酸を反応させ、核酸-プローブ複合体形成後、担体と結合させる方法、または、プローブと測定すべき核酸と担体とを同時に加えて、核酸-プローブ複合体形成を担体上で行わせる方法等がある。

後者は工程を簡略にできるので望ましい。

担体上に複合体を結合させた後、一般には担体の洗浄を行う。

洗浄は免疫学的測定で用いる公知の方法で行われる。

工程(B)について

本工程はバックグラウンドの原因となる、担体に非特異的に結合した標識プローブ及び非特異的核酸から、核酸-プローブ複合体を含む成分を選択的に分離する工程である。

複合体の解離は下記のいずれかの結合を切断して行う。

As this kind of example, -S-S- you can list connection, biotin-avidin connection, and antigen (haptens included.) -antibody connection etc.

It does step (A) with following protocol.

First, under condition which is used for suffering signal detection with conventional DNA probe method including probe of 2 kinds or more, conjugate which is formed from nucleic acid and probe which it should measure is formed.

It reacts generally 20 - 75 °C, several hours~several tens of hours, preferably 65~72 °C, 10~20 hour.

As for nucleic acid-probe conjugate which was formed in this way with condition which, is usually used for immunological measurement, it connects to support.

probe method reacting, after nucleic acid-probe conjugate formation, of connecting the nucleic acid which it should measure with support. Or, there is a method etc which does nucleic acid-probe conjugate formation on support probe in addition nucleic acid and support which it should measure to simultaneous.

Because the latter can make step simple, it is desirable.

conjugate after connecting, you wash support generally on support.

Washing is done with known method which is used with immunological measurement.

In step (B) being attached

From labelled probe and nonspecific nucleic acid where this process becomes cause of the background, connects to nonspecific in support, it is a step which the component which includes nucleic acid-probe conjugate selectively is separated.

dissociated of conjugate does cutting off connection of the below-mentioned any.

1)	官能基と反応基の結合
1)	Connection of functional group and reacted group
2)	官能基とプローブの結合
2)	Connection of functional group and probe
3)	反応基と担体の結合
3)	Connection of reacted group and support

ましい方法は、1 上記の結合に関与する結合物質対において、一方の物質と置換しうる反応部位を有する物質を加えること、2 還元剤または酸

It forces and method adds on one hand substance and substance which possesses substitutable reaction site in binding substance opposite which participates in

化剤を加えること、等である。

具体的には、結合がジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン-抗ハプテン抗体のときには、ジニトロフェニルアミノ酸(例:ジニトロフェニルリジン)、ビオチン-アビジンまたはストレプトアビジンのときには、ビオチンを添加する。

結合が-S-S-である場合、-S-S-を切断する試薬、例えば 2-メルカプトエタノール等を用いる。

工程(C)について

工程(B)で解離された核酸-プローブ複合体を含む成分を定量する工程である。

解離された核成分はそのまま溶液状態で定量しても良く、また他の担体に結合させ、洗浄後定量しても良い。

この他の担体への結合は公知の材料、方法にて行うことができる。

そして、免疫学的測定に通常用いられる方法で定量する。

測定法の例として、放射性同位元素、酵素、蛍光物質等を用いた方法が、臨床病理〔(The Japanese Journal of Clinical Pathology)、臨時増刊特集第 53 号、昭和 58 年 2 月 28 日発行〕に総括されている。

解離された核酸-プローブ複合体を含む成分を測定するには、核成分中の標識を用いる。

従って、工程(A)の項で記載したように、標識プローブを工程(A)のハイブリダイゼーションに用いない場合は、後の工程で反応基を結合させた標識を加え、核酸-プローブ複合体上の官能基に結合させて標識化を行う。

ここで用いる反応基と官能基は、工程(A)で担体と核酸-プローブ複合体との結合に用いる様なアフィニティ結合物質対であり、強い結合性を有するものが好ましい。

例としてアビジン-ビオチンが挙げられる。

反応基と結合させた標識は当分野で公知の方法により作成される。

標識と官能基及び反応基の選択は任意であるが、標識化に用いる反応基-官能基は、担体と

above-mentioned connection, 2 reductant or oxidant are added, such as is.

Concretely, when connection is di nitrophenyl group or tri nitrophenyl group or other hapten- anti- hapten antibody, when di nitrophenyl amino acid (Example: di nitrophenyl lysine), being a biotin-avidin or strept- pick-up probe7 avidin, biotin is added.

When connection -S-S- is, reagent, for example 2-mercaptoethanol etc which -S-S- is cut off is used.

In step (C) being attached

It is a step which component which includes nucleic acid-probe conjugate which dissociated is done quantification is done with step (B).

nucleus component which dissociated is done is good quantification that way, in addition connecting to other support doing with solution state, after washing quantification doing is good.

It connects to other support with material, method of public knowledge, it is possible densely.

And, quantification it does with method which, is usually used for immunological measurement.

As example of measurement method, method which uses corresponding radioactive element, enzyme, phosphor etc, is summarized in Japanese Journal of Clinical Pathology (0047 - 1860, RBYOAI) "(The Japanese Journal of Clinical Pathology) supplement special edition 5 th 3 number, 1983 February 28 day issues".

component which includes nucleic acid-probe conjugate which dissociated is done is measured, labelling in nucleus component is used.

Therefore, as stated with section of step (A), case labelled probe is not used for hybridization of step (A), connecting to functional group on nucleic acid-probe conjugate including labelling which connects reacted group with step after, it does labelling.

As for reacted group and functional group which are used here, in Affinity binding substance kind of opposite which is used for connection with support and the nucleic acid-probe conjugate with step (A), those which possess strong bonding ability are desirable.

You can list avidin-biotin as example.

labelling which is connected with reacted group is drawn up with this field by known method .

Selection of labelling and functional group and reacted group is option, but reacted group-functional group which is used

核酸-プローブ複合体の結合に関与している反応基-官能基とは異なるものを選ぶ。

また、担体との結合に関与しているプローブには標識を導入しない。

標識化する時点は任意であるが、溶液状態で定量する場合は、担体から核酸-プローブ複合体を最終的に解離する前に行う。

また、他の担体上で定量する場合は最終的な担体洗浄の前の適切な時点を選んで行う。

例を挙げれば、1 工程(A)の核酸-プローブ複合体形成後 2 工程(B)の複合体解離前 3 工程(C)の他の担体への複合体結合後、等である。

このハイブリダイゼーション終了後に標識を導入する方法は、特に酵素で標識する場合に好ましい。

一般に酵素の分子量は大きいので、酵素標識プローブを用いた場合、各プローブと、測定すべき核酸とのハイブリダイゼーションが阻害されるかも知れないからである。

以上説明したように、本発明は従来の核酸サンドイッチ法におけるバックグラウンドの原因であった、担体に非特異的に結合する標識プローブおよび非特異的な核酸を除くことにより、より高感度に特異的な核酸を定量する測定法を提供するものである。

以下、本発明を実施例に即して説明するがもとより、これに限られるものではない。

実施例 1

検体用 DNA 及びプローブ用 DNA の調製

測定の検体モデル用 DNA 及びその一部分と相補的な配列をもつ二種のプローブ用 DNA は、全自動 DNA 合成機 MODEL 381A(アプライド・バイオシステム、カルフォルニア州)を用い、同社の操作手引書に従い、公知の方法[M.D. マツーシ(M.D. Matteucci)ら、ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ(J. Am. Chem. Soc.)第 103 巻、第 3185 頁(1981)]で合成した。

合成後、150 シリーズセパレーションシステム(アプライド・バイオシステム)を用い、逆相の高速液

for labelling support and reacted group-functional group which has participated in connection of nucleic acid-probe conjugate chooses those which differ.

In addition, labelling is not introduced into probe which has participated in connection with support.

time point which labelling is done is option, but case quantification it does with solution state, finally dissociated before doing nucleic acid-probe conjugate, it does from support.

In addition, when quantification it does on other support, choosing the appropriate time point before final support washing, it does.

If example is listed, after conjugate connecting to other support of 3 step (C) before conjugate dissociated of 2 step (B) after nucleic acid-probe conjugate formation of 1 step (A), such as is.

method which introduces labelling after this hybridization ending, when the labelling it does with especially enzyme, is desirable.

Generally as for molecular weight of enzyme because it is large, when the enzyme labelled probe is used, high background of each probe and the nucleic acid which it should measure obstruction because you cannot know whether

Way above you explain, as for this invention it was a cause of background in conventional nucleic acid sandwich method, from specific nucleic acid it is something which offers measurement method which quantification it can do in high sensitivity by excluding labelled probe and the nonspecific nucleic acid which are connected to nonspecific in support.

Below, conforming to Working Example, you explain this invention, but from the first, it is not something which is limited to this.

Working Example 1

Manufacturing DNA for test agent and DNA for probe

It synthesized DNA and that one part for test agent model of measurement and DNA for probe of two kinds which has complementary sequence, with the known method "M.D. Matti (M.D. Matteucci) and others, journal of American chemical society (Journal of the American Chemical Society (0002 - 7863, JACSAT)) 10 th Vol. 3, third 185 page (1981)" making use of fully automatic DNA synthetic machine model 381A (Applied Biosystems, California), in accordance with operator pulling book of same company.

After synthesizing, it refined making use of 150 series separation system (Applied Biosystems), with the

体クロマトグラフィーにより精製を行った。

上記の方法で調製した各 DNA の塩基配列を以下に示す。

検体 DNA (51 塩基)

3' HO-ACGTTGCCGC CCCGCCGCCG CCTGTCGCTG
AGCTCGGACC TGCTCGGCAC G-OH 5'

5' HO-TGCAACGGCG GGGCGGCGGC-OH 3'
プローブ DNA-1 (20 塩基)
5' HO-CGAGCCTGG ACGAGCCGTG C-OH 3'
プローブ DNA-2 (20 塩基)

³²P 標識 DNA プローブの調製

プローブ DNA-2 10 μg (1.5 nmol) に対して [γ-³²P] アデノシン 3 リン酸 (アマシヤム・ジャパン、東京) 20 nmol (5 μCi/nmol) 及び T4 ポリヌクレオチド・キナーゼ (東洋紡、大阪) 80 単位を用い、公知方法 [C.C. リチャードソン (C.C. Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第 54 巻、第 158 頁 (1965)] で、5' 末端を ³²P 標識した。

次いで PD-10 カラム (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) を用いて 0.15 M 塩化ナトリウムおよび 1 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った後、70% エタノールで沈澱させて、プローブを精製した。

ビオチニル-DNA プローブの調製

プローブ DNA-1 10 μg (1.5 nmol) に対して、アデノシン 3 リン酸 (ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン) 80 nmol 及び T4 ポリヌクレオチド・キナーゼ 80 単位を用い、公知の方法 [C.C. リチャードソン (C.C. Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (前出)] で 5' 末端にリン酸基を導入した。

次いでリン酸基の先にアミノ基を導入し、N-ヒドロキシサクシニミジルビオチンを結合させる公知の方法 [C.F. バーバラ (C.F. Barbara) ら、ディーエヌエー (DNA)、第 4 巻、第 327 頁 (1985)] に従ってプローブ DNA の 5' 末端にビオチン分子を導入した。

反応後、前述同様 PD-10 カラムによるゲルろ過及びエタノール沈澱によりプローブの精製を行った。

high-performance liquid chromatography of reverse phase.

base sequence of each DNA which is manufactured with above-mentioned method is shown below.

<sup>32Plabelling DNA probe manufacturing

With publicly known method "C.C. Richardson (C.C. Richardson), proceedings of national academy of Science (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (0027 - 8424)) 5 th Vol.4, 15 th 8 page (1965)", 5 'terminal <sup>32Plabelling were done " ; ga — <sup>32P " adenosine triphosphate (Amersham * Japan, Tokyo) 20 nmol e (5 ; μ Ci/nmol e) and T4 polynucleotide * kinase (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160), Osaka) making use of 80 unit vis-a-vis probe DNA-2 10 ; μ g (1.5 nmol e).

Next after doing gel filtration with 0.15 Msodium chloride and 0.1 Msodium phosphate buffer which include 1 mM EDTA making use of PD-10 column (Pharmacia、Uppsala、Sweden), precipitating with 70% ethanol, itrefined probe.

Manufacturing Biot jp8 ニル DNA probe

Vis-a-vis probe DNA-1 10 ; μ g (1.5 nmol e), adenosine triphosphate (Pharmacia、Uppsala、Sweden) making use of 80 nmol e and T4 polynucleotide kinase 80 unit, phosphoric acid group was introduced into 5 'terminal with known method "C.C. Richardson (C.C. Richardson), proceedings of national academy of Science (depicted above)".

Next phosphoric acid group it introduced amino group first, following to known method "C.F. bar Rosa (rose) (C.F. Barbar a) and others, D. N. A. (DNA), Volume 4、third 27 page (1985)" which connects N- hydroxy サ comb ニミ di jp11 biotin, it introduced the biotin molecule into 5 'terminal of probe DNA.

After reacting, it refined probe with aforementioned similar PD-10 column with gel filtration and ethanol precipitation .

った。

³²P の放射活性の測定

各ポリスチレンボールに結合した ³²P 放射活性の測定は、ポリスチレンボールをキシレン系液体シンチレータ ACS II(アマシャム・ジャパン、東京)5ml を含むミニバイアル中で激しく攪拌した後、液体シンチレーションカウンター(パッカード、MINAXI TRI-CARB 4000)を用いて 5 分間計測で行った。

ジニトロフェニル-アビジン結合 ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化固相の調製

(1) ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化固相の調製

ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG(生化学工業、東京)4.23g を溶解した 0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.3)に 0.747g の硫酸ナトリウムを少しずつ加え、0℃ 30 分間攪拌した後 10,000 × g で 15 分間遠心した。

沈澱を 4.0ml の 0.0175M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.3)に溶解し、同緩衝液で透析した後、DE-52 セルロース(ワットマン、ケント州、イギリス)カラム(1.6 × 8.0cm)を用いて、塩化ナトリウムの直線濃度勾配による陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

IgG を含む分画を集め、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で透析した後 IgG 濃度を 280nm における吸光係数 $1.5\text{g}^{-1} \cdot 1\text{cm}^{-1}$ から求め、0.1g/script-l.になるように同緩衝液で希釈した。

次いで、この溶液を用いてポリスチレンボール[直径 3.2mm(プレシジョン・プラスチックボール、シカゴ)]表面上に公知の方法[石川ら、スカンジナビアン ジャーナル オブ イムノロジー(Scand.J.Immunol.)第 8 巻(補 7)第 43 頁(1978)]で、物理的吸着による不溶化した。

(2) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i)メルカプトサクシニル-アビジンの調製 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に溶解したアビジン D(ベクター社)1mg に S-アセチルメルカプトサクシニック-アンハイドライド(ナカライテスク、京都)を用いて、公知の方法[石川ら、ジャーナル オブ イムノアッセイ(J.Immunoassay)第 4 巻、第 209 頁(1983)]に従ってチオール基を導入した。

<sup>32P measurement of radioactivity

<sup>32Pradioactivity where it connects to each polystyrene ball measurement did with 5 min measurements polystyrene ball xylene liquid scintillator ACS II (Amersham * Japan, Tokyo) after agitating extremely inmini- vial which includes 5 ml, making use of liquid scintillation counter (Packard, MINAXI TRI-CARB 4000).

Manufacturing di nitrophenyl-avidin connection rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin)

IgGinsolubilization solid phase

Manufacturing (1) rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization solid phase

rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgG (Seikagaku Corporation (DB 69-058-4057), Tokyo) it added sodium sulfate of 0.747 g to 0.0175 M sodium phosphate buffer (pH 6.3) which melt 4.23 g little by little, 0 & 30 min after agitating, 15 min centrifugation it did with 10,000 X g.

Precipitation was melted in 0.0175 Msodium phosphate buffer (pH 6.3) of 4.0 ml, anion exchange chromatography was done with linear concentration gradient of sodium chloride dialysis after doing, making use of DE-52 cellulose (Whatman, Kent, England) column (1.6 X 8.0 cm) with same buffer.

You gathered fraction which includes IgG, with 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) the dialysis after doing, you sought from light absorption coefficient $1.5\text{g}^{-1} \cdot 1\text{cm}^{-1}$ in IgGconcentration 280 nm,in order to become 0.1 g/script-l., you diluted with same buffer.

Next, on polystyrene ball "diameter 3.2 mm (precision * plastic ball, Chicago)" surface with known method "Ishikawa and others and Scandinavian journal of イム cinder G. (Scand. Journal of Immunology (0022 - 1767, JOIMA3)) Vol.8 (Assistant 7) 4 th 3 page (1978)", insolubilization it did with physical adsorption making use of this solution.

Manufacturing (2) di nitrophenyl-avidin

avidin D which is melted in manufacturing 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.5) of (i) mercapto succinyl-avidin (vector corporation) following to known method "Ishikawa and others and journal of immunoassay (J.Imm unoassay) Volume 4, 20th 9 page (1983)" in 1 mg making use of S-acetyl mercapto-succinic-anhydride (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079), Kyoto), it introduced thiol group.

導入されたチオール基の数はアビジン 1 分子当たり 13 個であった。

(ii) マレイミド-ジニトロフェニル-L-リジンの調製

5.5mM 2,4-ジニトロフェニル-L-リジン塩酸塩(東京化成,東京)を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)1.7ml と、5.5mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート(同仁化学,熊本)を溶解した N,N-ジメチルホルムアミド 0.17ml とを 30°C で 30 分反応させた。

(iii) ジニトロフェニル-アビジンの調製

(i) で調製したメルカプトサクシニル-アビジン 0.54mg を溶解した、5mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)1.0ml と(ii)で調製したマレイミド-ジニトロフェニル-L-リジン溶液 0.43ml とを 30°C で 30 分反応させた後、同緩衝液に溶解した 0.1M N-エチルマレイミド(ナカライテスク,京都)5 μ .script-l. を加え 30°C で 15 分保温した。

反応液をセファデックス G-25(ファルマシア、スウェーデン)カラム(1.0 \times 30cm)を用い、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液でゲルろ過を行った。

アビジン 1 分子当たり導入されたジニトロフェニル基の数は 7 個であった。

(3) ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化固相の調製

(1) で調製したウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを、(2)で調製したジニトロフェニル-アビジンを溶解した(0.1g/.script-l.), 0.1M 塩化ナトリウムおよび 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で、30°C 10 時間保温して反応させた。

ポリスチレンボールは、0.1M 塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミンおよび 0.1%アジ化ナトリウムを含む 0.01M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)中で保存した。

ビオチン-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(1) N-ビオチン-2-メルカプトエチルアミンの調製

N-ヒドロキシサクシニミジル-ビオチン(ピアスケミカル,イリノイ州)に 2-メルカプトエチルアミンを用いて公知の方法[石川ら、バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション (Biochem.Biophys.Res.Comm.), 第 147 巻、第

Quantity of thiol group which is introduced was avidin per molecule 13.

Manufacturing (ii) maleimide-di nitrophenyl-L-lysine

5.5 0.1 Msodium phosphate buffer which include mM 2, 4- di nitrophenyl-L-lysine acetate (Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (DB 69-058-7365), Tokyo) (pH 7.0) 1.7 ml and 5.5 mM N-サ comb ニミ di ルー 6 -maleimide hexanoate N, N- dimethylformamide 0.1 7 ml which melts (Dojindo Laboratories, Kumamoto) 30 *with 30 min it reacted.

Manufacturing (iii) di nitrophenyl-avidin

mercapto succinyl-avidin 0.54 mg which is manufactured with (i) was melted, 5 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) areincluded, 30 * with 15 min temperature-holding it did 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 6.0) 1.0 ml and the maleimide-di nitrophenyl-L-lysine solution 0.43 ml which is manufactured with (ii) 30 * with 30 min reactionslater, 0.1 M N- ethyl maleimide which are melted in same buffer (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079), Kyoto) including5;mu.script-l..

reaction mixture making use of Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden) column (1.0 X 30 cm), gel filtration was done with0.1 Msodium phosphate buffer.

avidin per molecule number of di nitro えに jp11 bases which are introducedwas 7.

Manufacturing (3) di nitrophenyl-avidin connection rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization solid phase

di nitrophenyl-avidin which manufactures rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball which is manufacturedwith (1), with (2) was melted (0.1 g/.script-l.), 0.1 Msodium chloride and in 0.01 Msodium phosphate buffer (pH 7.0)which include 0.1% bovine blood serum albumin, 30 & 10 hours temperature-holding doing, it reacted.

polystyrene ball retained 0.1 Msodium chloride、 0.1% bovine blood serum albumin and in 0.01 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) which include 0.1%sodium azide.

Manufacturing Biot jp8 ニルー bovine blood serum albumin insolubilization solid phase

(1) N- Biot jp8 ニルー 2 -mercapto manufacturing ethyl amine

In N- hydroxy サ comb ニミ di ルー biotin (Pierce chemical, Illinois) thiol group wasintroduced with known method "Ishikawa and others and biochemical and biophysical research communication (Biochemical and Biophysical Research Communications (0006 - 291 X,

644 頁(1987)]でチオール基を導入した。

(2) マレイミド-ウシ血清アルブミンの調製ウシ血清アルブミン(ナカライテスク、京都)に N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを用い、公知の方法[橋田ら、ジャーナルオブ アブライド バイオケミストリー(J.Appl.Biochem.)第 6 巻、第 56 頁(1984)]に従ってマレイミド基を導入した。

導入されたマレイミド基の数は、ウシ血清アルブミン 1 分子当たり 11 個であった。

(3) ビチチニル-ウシ血清アルブミンの調製(2)で調製したマレイミド-ウシ血清アルブミン 10mg を溶解した 5mM EDTA を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)2.0ml に(1)で調製した N-ビオチニル-2-メルカプトエチルアミン溶液 0.22ml を加え 30°C、30 分反応させた。

反応後、0.1M 2-メルカプトエチルアミンを溶解した 5mM EDTA を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0)0.05ml を加え、セファデックス G-25(ファルマシア、スウェーデン)カラム(1.0 × 30cm)を用い、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5)でゲルろ過を行った。

ウシ血清アルブミン 1 分子当りに導入されたビオチン分子は 7 個であった。

(4) ビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(3)で調製したビオチニル-ウシ血清アルブミン溶液(0.1g/.script-l.)を用いて、ポリスチレンボール[直径 3.2mm(プレジジョン社、シカゴ)]表面上に公知の方法[石川ら、スカンジナビアンジャーナル オブ イムノロジー(前出)]で、物理的吸着により不溶化した。

検体 DNA の測定

種々の濃度に希釈した検体 DNA(n=6)、5ng の ³²P 標識 DNA プローブ、5ng のビオチニル-DNA プローブ、100ng のサケ精子の単鎖 DNA、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA および 0.1% ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml を 65°C、16 時間保温した。

室温に戻した後、ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを 1 個添加し、30°C5 時間反応させた。

ボールを 0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及

BBRCA)), 14 th 7 volumes, 6 th 44 page (1987)" 2 -mercapto making use of ethyl amine.

Following to known method "Hashida and others and journal of Applied biochemistry (J.Appl. Biochem.) Volume 6, 5th 6 page (1984)" in manufacturing bovine blood serum albumin (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079), Kyoto) of (2) maleimide-bovine blood serum albumin making use of N- サ comb ニミ di ルー 6 -maleimide hexanoate, it introduced maleimide group.

Quantity of maleimide group which is introduced was bovine blood serum albumin per molecule 11.

30 *, 30 min it reacted 0.1 Msodium phosphate buffer which include 5 mM EDTA which melt maleimide-bovine blood serum albumin 10 mg which is manufactured with manufacturing (2) of (3) ビ jp8 jp8 ニルー bovine blood serum albumin (pH 6.0) N- Biot jp8 ニルー which in 2.0 ml is manufactured with (1) 2 -mercapto including ethyl amine solution 0.22 ml.

After reacting, gel filtration was done with 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.5) 0.1 Msodium phosphate buffer which include 5 mM EDTA which melt 0.1 M 2- mercapto ethyl amines (pH 6.0) including 0.05 ml, making use of Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden) column (1.0 X 30 cm).

biotin molecule which is introduced into bovine blood serum albumin per molecule was 7.

(4) Manufacturing Biot jp8 ニルー bovine blood serum albumin insolubilization solid phase

Making use of Biot jp8 ニルー bovine blood serum albumin solution (0.1 g/.script-l.) which is manufactured with (3), with known method "Ishikawa and others and Scandinavian journal of イム cinder G. (depicted above)", insolubilization it did on polystyrene ball "diameter 3.2 mm (precision corporation, Chicago)" surface with physical adsorption .

Measurement of test agent DNA

test agent DNA which is diluted in various concentration (n=6), ³²Plabelling DNA probe, 5 ng single strand DNA、0.1 Msodium chloride、1 mM EDTA and 0.1%bovine blood serum albumin of salmon sperm of Biot jp8 ニルー DNA probe、100 ng of 5 ng are included, 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.15 ml were done 65 *, 16 hours temperature-holding.

After resetting to room temperature, 1 it added di nitrophenyl-avidin connection rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball, 30 & 5 hours reacted.

ball 0.15 Msodium chloride、1 mM EDTA and 0.1 Msodium

び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)2ml で 2 回洗浄した後、150nmole のジニトロフェノール-L-リジン(東京化成工業、東京)を溶解した、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml 中でビオチニル-ウシ血清アルブミン不溶化ポリスチレンボール 1 個とともに 30°C、2 時間反応させた。

ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを除去した後、さらに 30°C、3 時間反応させた。

ポリスチレンボールを上述と同様に洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した ³²P の放射活性を測定した。

結果を第 1 図に示す。

比較例 1

検体用およびプローブ用 DNA の調製、固相の調製、および放射活性の測定は実施例 1 の方法に従った。

検体 DNA の測定

種々の濃度に希釈した検体 DNA(n=6)、5ng の ³²P 標識 DNA プローブ、5ng のビオチニル-DNA プローブ、100ng のサケ精子の単鎖 DNA、0.15M 塩化ナトリウム 1mM EDTA および 0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml を 65°C、16 時間保温した。

室温に戻した後、ジニトロフェニル-アビジン結合ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを 1 個添加し、30°Cで 5 時間反応させた。

ポリスチレンボールを 0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)2ml で 2 回洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した ³²P の放射活性を測定した。

結果を第 1 図に示す。

本発明による実施例の測定限界は 10pg(0.6fmole)であった。

従来法である比較例に比して、バックグラウンドが約 1/8 に減少し、3 倍の感度向上が認められた。

実施例 2

phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) the twice after washing with 2 ml, di nitro phenol-L-lysine (Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (DB 69-058-7365), Tokyo) of 150 nmol e was melted, 0.15 Msodium chloride, 1 mM EDTA and 0.1 Msodium phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) with the Biot jp8 ニルー bovine blood serum albumin insolubilization polystyrene ball 1 30 *, 2 hours it reacted in 0.15 ml.

After removing di nitrophenyl-avidin connection rabbit (Anti-di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball, furthermore 30 *, 3 hours it reacted.

polystyrene ball after washing in same way as description above, ³²P where it connects to polystyrene ball radioactivity was measured.

Result is shown in Figure 1.

Comparative Example 1

You followed manufacturing test agent and DNA for probe, manufacturing solid phase, and measuring radioactivity method of the Working Example 1.

Measurement of test agent DNA

test agent DNA which is diluted in various concentration (n=6), ³²P labelling DNA probe, 5 ng single strand DNA, 0.1 Msodium chloride 1 mM EDTA and 0.1%bovine blood serum albumin of salmon sperm of Biot jp8 ニルー DNA probe, 100 ng of 5 ng are included, 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.15 ml were done 65 *, 16 hours temperature-holding.

After resetting to room temperature, 1 it added di nitrophenyl-avidin connection rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball, 30 * with 5 hours reacted.

polystyrene ball 0.15 Msodium chloride, 1 mM EDTA and 0.1 Msodium phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) the twice after washing with 2 ml, ³²P where it connects to the polystyrene ball radioactivity was measured.

Result is shown in Figure 1.

measurement limit of Working Example was 10 pg (0.6 fmole) with this invention .

Comparing to Comparative Example which is a prior art method, background approximately decreased to 1/8, could recognize sensitivity improvement of 3 times.

Working Example 2

検体用 DNA 及びプローブ用 DNA の調製、³²P 識別 DNA プローブの調製、及びウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化固相の調製は実施例 1 の方法に従った。

ジニトロフェニル-DNA プローブの調製

(1) 5'-アミノヘキシルホスホールアミデート-DNA の調製

プローブ DNA-1 10 μ g (1.5nmole)に対して、アデノシン 3 リン酸(ファルマシア、ウブサラ、スウェーデン)80nmole 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 80 単位を用い、公知の方法[C.C.リチャードソン(C.C.Richardson)、プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス(前出)]で 5' 末端にリン酸基を導入した。

次いで、0.1M イミダゾール-塩酸緩衝液(pH6.0)で、1-エチル-3,3'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(ナカライテスク、京都)により導入したリン酸基に イミド基を結合させた後、1,6-ジアミノヘキサン(ナカライテスク)を反応させる公知の方法[A.コレット(A.Chollet)ら、ヌクレイックアシズリサーチ(Nucleic Acids Res.)、第 13 巻、第 1529 頁(1985)]に従って、5' -末端にアミノ基を導入した。

(2) サクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル- ξ -カプロン酸の合成

2,4-ジニトロフェニル- ξ -カプロン酸(シグマ社、ミズーリ州)と、N-ヒドロキシサクシニミド(和光純薬工業、大阪)をジクロロカルボジイミド(和光純薬工業)により縮合される公知の方法[F.レヴィ・シェーファー(F.levi-schaffer)ら、アメリカン ジャーナル オブ トロピカル メディスン アンド ハイジーン(Am.J.Trop.Med.Hyg.)、第 32 巻、第 343 頁(1983)]によりサクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル- ξ -カプロン酸を合成した。次いで、シリカゲル(40g)カラムを用い、クロロホルム/メタノール[40/1(V/V)]の系で精製を行った後、NMR(核磁気共鳴法)および質量スペクトル法による製造を確認した。(3) ジニトロフェニル-DNA プローブの調製 (1)で調製した 5'-アミノヘキシルホスホールアミデート-DNA 150pmole を溶解した 0.01M リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)50 μ l に、(2)で調製したサクシニミジル-2,4-ジニトロフェニル- ξ -カプロン酸 50nmole を含む N,N-ジメチルホルムアミド 50 μ l を加え、20°C、20 時間反応させた。反応後 RPC-5 カラム(アプライド・バイオシステム)を用いる公知の方法[R.L.ピアソン(R.L.Peason)ら、バイオケミカル エト バイオフィ

Manufacturing DNA for test agent and DNA for probe, ^{32P} you followed manufacturing identification DNA probe, and manufacturing rabbit (Anti-di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgG insolubilization solid phase method of Working Example 1.

Manufacturing di nitrophenyl-DNA probe

(1) Manufacturing 5'-amino hexyl phospho— Lu amidate-DNA

Vis-a-vis probe DNA-110; μ g (1.5 nmol e), adenosine triphosphate (Pharmacia, Uppsala, Sweden) making use of 80 nmol e and T4 polynucleotide kinase 80 unit, phosphoric acid group was introduced into 5' terminal with known method "C.C. Richardson (C.C. Richardson), proceedings of national academy of Science (depicted above)".

Next, with 0.1 Mimidazole-hydrochloric acid buffer (pH 6.0), imido group after connecting, 1,6 -diamino hexane following (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079)) to known method "A. collet (A.Chollet) and others, nucleic アシ missalignment search (Nucleic Acids Research (0305 - 1048, NARHAD)), Vol.13, 15 th 29 page (1985)" which reacts in phosphoric acid group which is introduced 1 -ethyl-3, 3-dimethylaminopropyl carbodiimide due to (Nacalai Tesque Inc. (DB 69-053-8079), Kyoto), it introduced amino group into 5'-terminal.

(2) サ comb ニミ di ルー 2 and 4 -di nitrophenyl- ξ -caproic acid synthesis

2 and 4 -di nitrophenyl- the; ξ -caproic acid (Sigma Chemical Co., Missouri) with, N- hydroxy サ comb ニミド (Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DB 69-059-8875), Osaka) the known method which is condensed by dichloro carbodiimide (Wako Pure Chemical Industries Ltd. (DB 69-059-8875)) "F. レビ *Schafer (F.levi-schaffer) and others, アメ rear ン journal of tropical メ D. スン and high gene (サ comb ニミ di ルー 2 and 4 -di nitrophenyl- the; ξ -caproic acid was synthesized Am.J.Trop.Med.Hyg., Vol.32, third 43 page (1983)) with. Next, after refining with system of chloroform/methanol "40/1 (V/V)" making use of the silica gel (40 g) column, nmr (nuclear magnetic resonance method) and production was verified with mass spectrum method. 0.01 M potassium phosphate buffer which melt 5'-amino hexyl phospho— Lu amidate-DNA 150 pmol e which are manufactured with manufacturing (1) of (3) di nitrophenyl-DNA probe (pH 7.5) in 50; μ l, 20 *, 20 hour it reacted サ comb ニミ di ルー 2 which is manufactured with (2) and 4 -di nitrophenyl- including N, N-dimethylformamide 50 ; μ l which the; ξ -caproic acid 50 nmol e is included. After reacting doing high-performance liquid chromatography with known method "R.L. Pia ソン

ジカ アクタ(Biochem.Biophys.Acta)、第 228 巻、第 770 頁(1971)]で高速液体クロマトグラフィーを行って未反応 DNA を除き、さらにエタノール沈澱によりプローブを精製した。³²P の放射活性の測定 反応溶液中に含まれる ³²P 放射活性の測定は、反応溶液全量(150 μ l)をキシレン系液体シンチレータ ACS II(アマシャム・ジャパン、東京)5ml を含むミニバイアル中で激しく攪拌した後、液体シンチレーションカウンター(パッカード、MINAXI TRI-CARB 4000)を用いて 5 分間計測で行った。検体 DNA の測定 種々の濃度に希釈した検体 DNA(n=6)、2ng の ³²P 標識 DNA プローブ、2ng のジニトロフェニル-DNA プローブ、100ng のサケ精子の単鎖 DNA、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA および 0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml を 65°C、16 時間保温した。室温に戻した後、ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを 1 個添加し、30°C、5 時間反応させた。ボールを 0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)2ml で 2 回洗浄した後、150nmole のジニトロフェニル-L-リジン(東京化成工業、東京)を溶解した、0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml 中で 30°C、2 時間反応させた。反応後溶液 150 μ l 全量を取り、標識 DNA プローブの ³²P 放射活性を測定した。結果を第 2 図に示す。比較例 2 検体 DNA、ジニトロフェニル DNA プローブ、³²P 標識 DNA プローブおよびウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化固相の調製は実施例 1 の方法に従った。³²P 放射活性の測定 各ポリスチレンボールに結合した ³²P 標識 DNA プローブの放射活性の測定は、ポリスチレンボールを液体シンチレータを含むミニバイアルに入れ、実施例と同様の条件で計測を行った。検体 DNA の測定 種々の濃度に希釈した検体 DNA(n=6)、2ng の ³²P 標識 DNA プローブ、2ng のジニトロフェニル-DNA プローブ、100ng のサケ精子の単鎖 DNA、0.15M 塩化ナトリウム-1mM EDTA および 0.1%ウシ血清アルブミンを含む、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)0.15ml を 65°C、16 時間保温した。室温に戻した後、ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG 不溶化ポリスチレンボールを 1 個添加し、30°Cで 5 時間反応させた。ポリスチレンボールを 0.15M 塩化ナトリウム、1mM EDTA 及び 0.1%ウシ血清アルブミンを含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)2ml で 2 回洗浄した後、ポリスチレンボールに結合した ³²P の放射活性を測定した。結果

(R.L.Pearson) and others, biochemical エ jp7 bio フィ di mosquito Acta (Biochimica et Biophysica Acta (0005 - 2728, BBBMBS)),22 nd 8 volumes, 7 th 70 page (1971)" which uses RPC-5 column (Applied Biosystems), it refined probe excluding unreacted DNA, furthermore with the ethanol precipitation . <sup>32Pradioactivity where <sup>32P is included in measurement reaction solution of radioactivity measurement did with 5 min measurements reaction solution total amount (150; μ l) xylene liquid scintillator ACS II (Amersham * Japan, Tokyo) after agitating extremely in mini- vial which includes 5 ml, making use of liquid scintillation counter (Packard, MINAXI TRI-CARB 4000). test agent DNA which is diluted in measurement various concentration of test agent DNA (n=6),<sup>32Plabelling DNA probe, 2 ng single strand DNA, 0.1 Msodium chloride, 1 mM EDTA and 0.1% bovine blood serum albumin of salmon sperm of di nitrophenyl-DNA probe, 100 ng of 2 ng are included, 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.15 ml were done 65 *, 16 hours temperature-holding. After resetting to room temperature, 1 it added rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball, 30 *, 5 hours reacted. ball 0.15 Msodium chloride, 1 mM EDTA and 0.1 Msodium phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) the twice after washing with 2 ml, di nitro phenol-L-lysine (Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd. (DB 69-058-7365), Tokyo) of 150 nmol e wasmelted, 0.15 Msodium chloride, 1 mM EDTA and 0.1 Msodium phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) 30 *, 2 hours it reacted in 0.15 ml. After reacting solution 150 ; μ l total amount was taken, labelling DNA probe <sup>32Pradioactivity wasmeasured. Result is shown in Figure 2. You followed manufacturing Comparative Example 2 test agent DNA, di nitrophenyl DNA probe, ³²Plabelling DNA probe and rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization solid phase method of Working Example 1. <sup>32Plabelling DNA probe where <sup>32Pradioactivity connects to measurement each poly Estyrene ball polystyrene ball you inserted measurement of radioactivity, in mini- vial whichincludes liquid scintillator, you measured with condition which is similar to Working Example. test agent DNA which is diluted in measurement various concentration of test agent DNA (n=6),<sup>32Plabelling DNA probe, 2 ng single strand DNA, 0.1 Msodium chloride-1 mM EDTA and 0.1% bovine blood serum albumin of salmon sperm of di nitrophenyl-DNA probe, 100 ng of 2 ng are included, 0.1 Msodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.15 ml were done 65 *, 16 hours temperature-holding. After resetting to room temperature, 1 it added rabbit (Anti- di nitrophenyl-bovine blood serum albumin) IgGinsolubilization polystyrene ball, 30 * with5 hours reacted. polystyrene ball 0.15 Msodium

を第 2 図に示す。本発明による実施例の測定限界は 0.9pg($50\text{ amole}=5\times 10^{-7}\text{ mole}$)であった。従来法である比較例に比して、バックグラウンドが約 1/3 に減少し、3 倍の感度向上が認められた。〔効果〕以上、説明したように、本発明は従来サンドイッチ法で測定しえた核酸を、より高感度に測定しうる方法を提供するものである。〕

【図面の簡単な説明】

第 1 図及び第 2 図は、本発明の実施例、及び比較例の DNA 測定における検量線である。

横軸は、測定対象の DNA 量、縦軸に測定値 (^{32}P 放射活性)を示した。

【第 1 図】

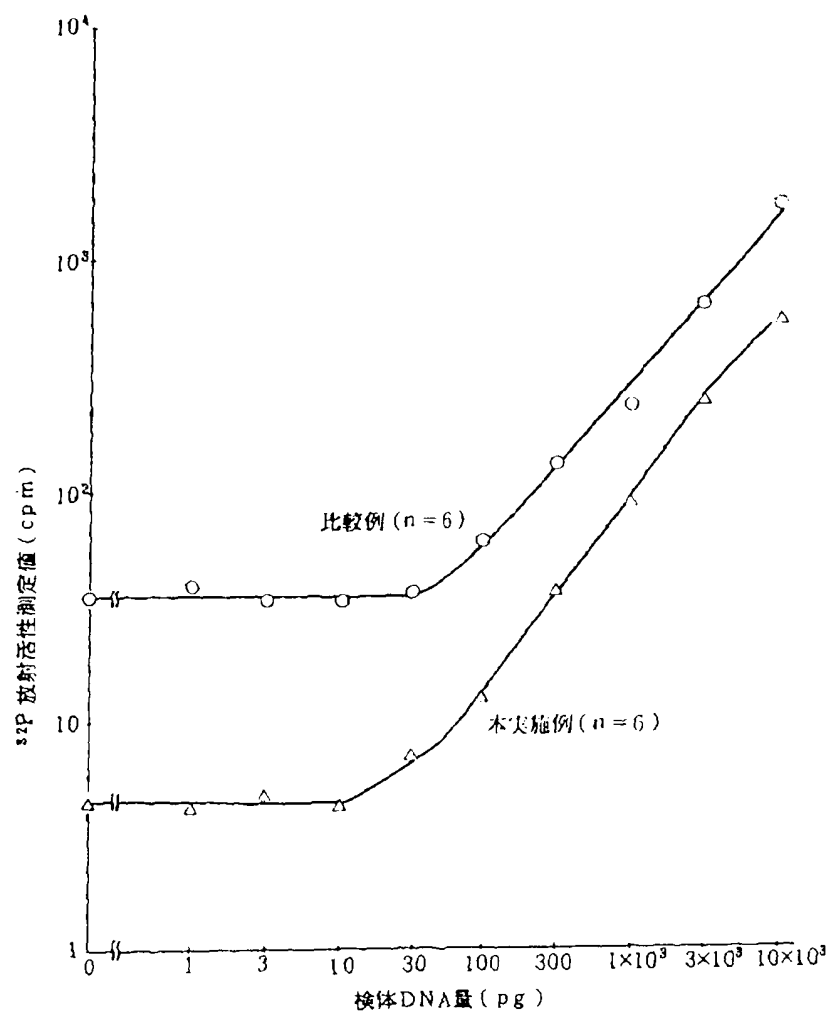
chloride, 1 mM EDTA and 0.1 M sodium phosphate buffer which include 0.1% bovine blood serum albumin (pH 7.0) the twice after washing with 2 ml, ^{32}P where it connects to the polystyrene ball radioactivity was measured. Result is shown in Figure 2. measurement limit of Working Example was 0.9 pg ($50\text{ amole}=5\times 10^{-7}\text{ mole}$) with this invention. Comparing to Comparative Example which is a prior art method, background approximately decreased to 1/3, could recognize sensitivity improvement of 3 times. As above "Effect", explained, this invention is something which offers the method which from can measure nucleic acid which it can measure until recently with sandwich method, in high sensitivity.)"

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

As for Figure 1 and Figure 2, a Working Example, of this invention and a measuring line in DNA measuring of Comparative Example it is.

horizontal axis showed measured value (^{32}P radioactivity) in DNA amount, vertical axis of measurement subject.

[Figure 1]



【第2図】

[Figure 2]

